

## 坐骨神経切除による筋萎縮に対する大豆たん白質とホエイたん白質の相加効果

二川 健<sup>\*1</sup>・橋本理恵<sup>1</sup>・中尾玲子<sup>1,2</sup>・内田貴之<sup>1</sup>・二宮みゆき<sup>1</sup>・木森有希<sup>1</sup>・真板綾子<sup>1</sup>・  
鉄野文香<sup>1</sup>・井田くるみ<sup>1</sup>・岸本ひかる<sup>1</sup>・高木麻里奈<sup>1</sup>・楊河宏章<sup>3</sup>・西良浩一<sup>4</sup>

<sup>1</sup>徳島大学・大学院医歯薬学研究部・生体栄養学分野

<sup>2</sup>産業総合研究所

<sup>3</sup>徳島大学臨床試験管理センター

<sup>4</sup>徳島大学・大学院医歯薬学研究部・運動機能外科学分野

## Effects of Dietary Soy Protein and Whey Protein on Denervation-induced Skeletal Muscle Atrophy

Takeshi NIKAWA<sup>\*1</sup>, Rie HASHIMOTO<sup>1</sup>, Reiko NAKAO<sup>1,2</sup>, Takayuki UCHIDA<sup>1</sup>,  
Miyuki NINOMIYA<sup>1</sup>, Yuki KIMORI<sup>1</sup>, Ayako MAITA<sup>1</sup>, Ayaka TETSUNO<sup>1</sup>, Kurimi IDA<sup>1</sup>,  
Hikaru KISHIMOTO<sup>1</sup>, Marina TAKAGI<sup>1</sup>, Hiroaki YANAGAWA<sup>3</sup> and Koichi SAIRYO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Nutritional Physiology, Institute of Medical Nutrition, Tokushima University  
Graduate School, Tokushima 770-8503

<sup>2</sup>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba 305-8561

<sup>3</sup>Tokushima University Hospital, Clinical Trial Center for Developmental Therapeutics,  
Tokushima 770-8503

<sup>4</sup>Department of Orthopedics, Institute of Medical Sciences, Tokushima University Graduate  
School, Tokushima 770-8503

### ABSTRACT

Soy protein and whey protein are beneficial dietary proteins against unloading-mediated muscle atrophy, although they have distinct effects on the muscle atrophy. Soy protein has inhibitory effect on muscle protein degradation, while whey protein stimulates muscle protein synthesis. We reported here whether they have an additional effect on muscle atrophy, when the mixed diet with soy and whey proteins were subjected to denervated mice. We found that the ratio of the mixed protein diet was most effective to prevent the denervation-induced muscle atrophy. Thus, we are planning to perform the dietary intervention examination with the ratio of the mixed soy and whey protein diet for bed-rested people next year. *Soy Protein Research, Japan* **20**, 8-12, 2017.

Key words : denervation, muscle atrophy, whey protein, soy protein

\*〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15

我々は、これまで大豆たん白質 (Soy protein isolate, SPI) は、実験動物や入院中の患者において筋たん白質分解を抑制することを明らかにした。大豆たん白質にはCblin (DGpYMP) 様配列が含まれており、骨格筋においてCbl-bとその基質であるIRS-1との結合を阻害することで、筋たん白質分解を抑制する<sup>1)</sup>。一方、ホエイたん白質は、筋たん白質合成を刺激することが知られている<sup>2)</sup>。ホエイたん白質にはロイシンが特に多く含まれており、それが筋たん白質合成経路を活性化すると考えられている。これらのことは、ホエイたん白質が大豆たん白質とは異なるメカニズムで骨格筋萎縮を抑制しうることを示唆している。以上の知見より、筋たん白質の分解を抑制する大豆たん白質単独の摂取よりも、筋たん白質の合成を促進するホエイたん白質を同時に摂取した方がよいのではないかと考えた。そこで、本研究では、大豆たん白質とホエイたん白質の坐骨神経切除による筋萎縮抑制効果を検討した。

大豆たん白質およびホエイたん白質の廃用性筋萎縮への効果を検討することで、廃用性筋萎縮の予防・治療の発展、寝たきりの患者のQOLの向上や、宇宙飛行士の充実した長期宇宙飛行に貢献できると考えている。

## 方 法

### C57BL/6マウスにおける摂食実験

6週齢のC57BL/6雄マウス (n = 6) を、1週間予備飼育後、4試験食 (カゼイン食、大豆たん白食、ホエイたん白質、大豆たん白質+ホエイたん白質食:各試験食ともに総カロリー中20%たん白質含有) の摂食を開始し2週間後、左足に坐骨神経切除を施した。坐骨神経切除4日後に屠殺し、下肢の筋肉を摘出した。試験食は、自由摂食とした。

### 試験食

各試験食の組成を以下に示す。単位はグラムである。

Products	Casein	Soy	Whey	Soy+Whey		
				1:1	1:2	2:1
Casein	20	0	0	0		
Soy protein	0	19.8	0	9.9	6.6	13.2
Whey protein	0	0	22.4	11.2	14.9	7.5
L-Cystine	0.3	0.3	0.3	0.3		
$\beta$ -Starch	39.9	39.9	39.9	39.9		
$\alpha$ -Starch	13.2	13.2	13.2	13.2		
Lactose hydrate	2.5	2.5	0	1.25		
Sucrose	7.7	7.7	7.7	7.7		
Soybean oil	7	7	5.8	6.4		
Cellulose	5	5	5	5		
Mineral mix	3.5	3.5	3.5	3.5		
Vitamin mix	1	1	1	1		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0	0	0.2	0.1		
t-Butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014		

### ウエスタンブロット法

たん白質をSDS化後、8% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。ゲル中のたん白質はセミドライプロットティング (ATTO) を用いてpolyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (BIO-RAD) に転写した。転写後、PVDF膜を4%精製ミルクカゼインで1時間ブロッキングし、0.05% Tween-20を含むPBS (PBS-T) で洗浄した。次に、希釈した一次抗体 [抗IRS-1抗体 (MILLIPORE)、抗p-Akt抗体、抗t-Akt抗体、抗GAPDH抗体 (Santa Cruz Biotechnology)] と膜を37℃で1時間または4℃で1晩反応させた。PBS-Tで洗浄後、希釈した二次抗体 [抗マウスIgG抗体 (GE Healthcare)、抗ウサギIgG抗体 (GE Healthcare)] と37℃でさらに1時間反応させた。洗浄後、Enhanced Chemiluminescence検出システム (GE Healthcare) を用いて抗体と反応したたん白質を検出した。

### Real Time RT-PCR法

SYBR<sup>TM</sup> Green dyeを用い、ABI 7300リアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用した。使用したプライマーの配列を以下に示す。

Cbl-b	S	5'-GAGCCTCGCAGGACTATGAC-3'
	AS	5'-CTGGCCACTTCCACGTTATT-3'
Atrogin-1	S	5'-GGCGGACGGCTGGAA-3'
	AS	5'-CAGATTCTCCTTACTGTATACCTCCTTGT-3'
MuRF-1	S	5'-ACGAGAAGAAGAGCGAGCTG-3'
	AS	5'-CTTGGCACTTGAGAGAGGAAGG-3'

GAPDH S 5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3'  
 AS 5'-TTCAGCTCTGGGATGACCTT-3'  
 (S: sense primer, AS: antisense primer.)

### 統計処理

データは平均±標準偏差で表した。また、統計学的有意差は解析ソフトSPSS (release 6. 1, SPSS Japan) を用いてDuncan's multiple range testで検定し、 $p < 0.05$ を有意とした。

## 結 果

### 筋湿重量低下に対する試験食の効果

腓腹筋の筋湿重量を計測した結果、カゼイン食群において、4日間の坐骨神経切除は湿重量を14.5%減少させた。これに対し、大豆たん白質、ホエイたん白質、大豆たん白質+ホエイたん白質(比率1:1, 1:2, 2:1)食群の筋湿重量低下はそれぞれ6.2%, 10.3%, 4.0%, 6.3%, 6.4%にとどまり、1:1の比率で混合した大豆たん白質+ホエイたん白質食群において最小値を示した(Fig. 1)。

### IRS-1量減少に対する試験食の効果

腓腹筋内のIRS-1量をウエスタンブロット法で確認した。

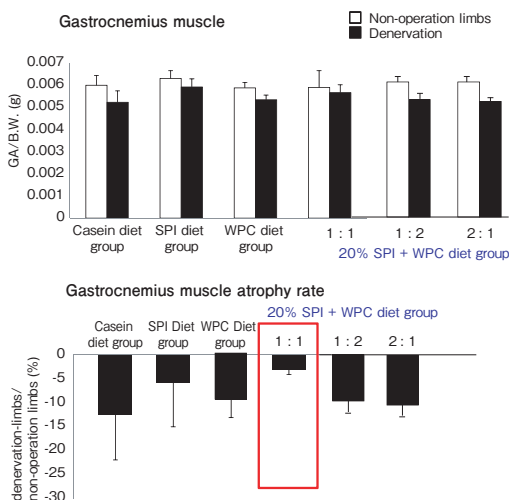


Fig. 1. Effect of various protein diets on denervation-induced gastrocnemius muscle wet weight loss. We administered casein control, soy protein (SPI) diet, whey protein concentrate (WPC) diet, and SPI+WPC diet to mice for 10 days. Mice were denervated, and gastrocnemius muscles were isolated and weighed after 4 days.



Fig. 2. Effect of various protein diets on IRS-1 degradation caused by denervation. We administered casein control, soy protein t (SPI) diet, whey protein concentrate (WPC) diet, and SPI+WPC diet to mice for 10 days. Mice were denervated, and gastrocnemius muscles were isolated and weighed after 4 days. The homogenates of gastrocnemius muscle were subjected to Western blotting for IRS-1.

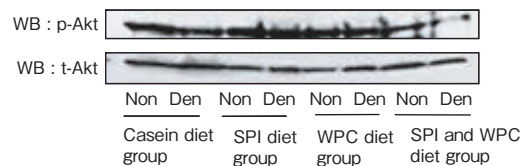


Fig. 3. Effects of various protein diets on dephosphorylation of Akt-1 caused by denervation. We administered casein control, soy protein t (SPI) diet, whey protein concentrate (WPC) diet, and SPI+WPC diet to mice for 10 days. Mice were denervated, and gastrocnemius muscles were isolated and weighed after 4 days. The homogenates of gastrocnemius muscle were subjected to Western blotting for phosphorylated Akt-1 and total Akt-1.

カゼイン食群において、坐骨神経切除により、IRS-1の減少が確認された。これに対し、大豆たん白質食、ホエイたん白質食、大豆たん白質+ホエイたん白質食群はIRS-1の分解が抑制され、中でも大豆たん白質+ホエイたん白質食摂取群において、最もIRS-1分解抑制効果が示された(Fig. 2)。

### リン酸化Akt量減少に対する試験食の効果

カゼイン食群において、坐骨神経切除により、リン酸化Akt量の減少がみられたが、大豆たん白質食、ホエイたん白質食、大豆たん白質+ホエイたん白質食群においてはこの減少が抑制された。なかでも大豆たん白質食の摂取が最もこの抑制効果が高かった(Fig. 3)。

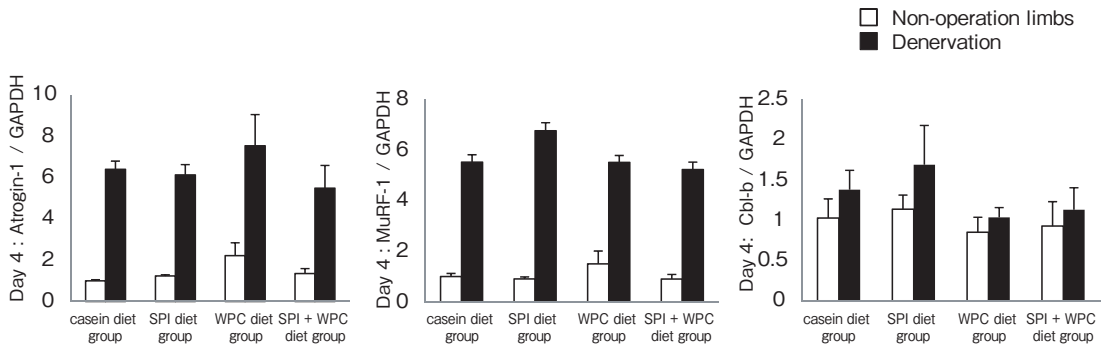


Fig. 4. Effects of various protein diets on denervation-induced atrogene expression in gastrocnemius muscle. We administered casein control, soy protein t (SPI) diet, whey protein concentrate (WPC) diet, and SPI + WPC diet to mice for 10 days. Mice were denervated, and gastrocnemius muscles were isolated and weighed after 4 days. Total RNA was extracted from gastrocnemius muscle and subjected to real time RT-PCR for atrogene.

### 筋萎縮関連遺伝子に対する試験食の効果

4日間の坐骨神経切除により、Atrogin-1、MuRF-1の発現量は有意に増加した。大豆たん白質およびホエイたん白質摂取による筋萎縮関連遺伝子の発現抑制は、4日間の坐骨神経切除においてはみられなかった。しかしながら、Cblb発現量は、4日間の坐骨神経切除により有意に上昇したが、ホエイたん白質食、大豆たん白質+ホエイたん白質食の2群間で発現量の抑制傾向が見られた (Fig. 4)。

## 考 察

本研究では、筋萎縮に対する様々な食餌性たん白質の効果を検討した。本試験では、試験食として、カゼイン食、大豆たん白質食、ホエイたん白質食、大豆たん白質・ホエイたん白質 (1:1, 1:2, 2:1) の混合食を用いた。その結果、6つの試験食の中で、1:1の比で混合した大豆たん白質・ホエイたん白質混合食が最も効果的に筋萎縮を抑制していた。

これまでの研究より、大豆たん白質は、筋たん白質分解を抑制することが明らかになっている。本研究においても大豆たん白質の摂取はIRS-1の分解を抑制し、筋萎縮関連遺伝子の発現を抑制していた。大豆たん白質は、骨格筋においてCblbとその基質であるIRS-1との結合を阻害することで、筋たん白質分解を抑制することも見出した。大豆たん白質の原料となる大豆は、全体の35%をたん白質が占めており、たん白質を豊富に含む食品である。大豆たん白質を構成する主要たん白質は、グリシニン (約40%)、 $\beta$ -コングリシニン (約

20%) および脂質を会合しているたん白質 (約40%) の3種類であることが明らかになっている。大豆たん白質の主要な構成たん白質であるグリシニンにおいて、筋萎縮抑制効果を持つCblinと類似するアミノ酸配列が発見されている。グリシニンたん白質のサブユニットをマルチプルアライメントした結果、全5種類のサブユニットのうち、4つがCblinと類似した配列を有していることが明らかになった。カゼイン食群とグリシニン食摂取群におけるIRS-1発現量を検討した実験において、グリシニン食摂取群で坐骨神経切除を施した足の筋肉におけるIRS-1の分解が抑制され、そのユビキチン化も抑制されていることが分かっている<sup>3)</sup>。

一方、筋たん白質合成を促進する食品成分として、ロイシンを多く含むホエイたん白質が注目されている。分岐鎖アミノ酸であるロイシンは、筋たん白質合成経路を活性化すると考えられている。たん白質の栄養価を示す指標である生物価やたん白質効率において、ホエイたん白質は全卵に匹敵しており、カゼインや大豆たん白質と比較して、より優れていることがわかっている。また、ホエイたん白質は構成アミノ酸の約20%が分岐鎖アミノ酸と含量が多く、さらにバリン:ロイシン:イソロイシン=1:2:1の比率で含まれ、ロイシン含量が多いという特徴がある。分岐鎖アミノ酸が翻訳開始段階の活性化をもたらし、たん白質合成を亢進させることが報告されている。特に、ホエイたん白質に豊富に含まれているロイシンは、Ras homolog enriched in brain (Rheb) と mammalian target of rapamycin (mTOR) の結合を促進し、mTORを介したS6KおよびeIF4E binding protein (4E-BP) のリン酸化が起こり、たん白質合成が促進される<sup>4)</sup>。たん

白質の生体利用性を考慮すると、大豆、カゼインに比べホエイたん白質は摂取後、速やかに吸収され、血中アミノ酸濃度の上昇が早いことも報告されており、たん白質合成の促進作用が注目されている<sup>5)</sup>。興味深いことに、今回ホエイたん白質を含む食事がユビキチン化酵素であるCbl-bの発現を抑制する傾向を示した。ホエイたん白質は筋たん白質の合成系だけでなく、分解系にも影響を与えるのかもしれない。

前述したように、大豆たん白質が筋たん白質の分解抑制に作用するのに対し、ホエイたん白質は筋たん白質の合成促進に作用する。つまり、大豆たん白質とホエイたん白質は、異なるメカニズムで骨格筋萎縮を抑制しうることが示唆されている。以上の知見より、筋たん白質の分解を抑制する大豆たん白質と筋たん白質の

合成を促進するホエイたん白質を同時に摂取することで、それらの単独摂取よりも効果的に筋萎縮を抑制できたのではないかと考えている。しかし、これらの同時摂取がどのようなメカニズムで筋萎縮を抑制しているのかはまだ明らかになっていない。また、本研究では、大豆たん白質とホエイたん白質を1:1の割合で配合したものが、最も効果的かつ相加的な筋萎縮抑制効果を示した。おそらく、それぞれの作用を示すためには、有効成分の必要最小限の量があるのだろう。以上の所見を基に、今年度は寝たきりの患者での大豆たん白質とホエイたん白質混合食の有効性を実証するため、徳島大学附属病院の関連施設を利用して、大豆たん白質とホエイたん白質を1:1の割合で配合したものの食事介入試験を実施する予定である。

## 要 約

大豆たん白質とホエイたん白質はともに筋萎縮に有効であることが報告されている。しかし、前者は筋たん白質分解系を阻害し、後者は筋たん白質合成系を刺激すると考えられており、その筋萎縮抑制効果のメカニズムは異なるとされている。そこで、我々は、大豆たん白質とホエイたん白質を混合すれば、より強い筋萎縮抑制効果を得られるのではないかと考えた。平成27年度は、大豆たん白質とホエイたん白質を1:1に今後した20%混合たん白質食が、大豆たん白質やホエイたん白質単独で与えるより、坐骨神経切断による筋萎縮に対して強い相加的な抑制効果を示すことを示した。平成28年度は大豆たん白質とホエイたん白質を1:1だけでなく、2:1または1:2とした混合食をマウスに与え、その効果を比較した。その結果、大豆たん白質とホエイたん白質を1:1の混合食が最も強い筋萎縮効果を示した。

## 文 献

- 1) Nikawa T, Ishidoh K, Hirasaka K, Ishihara I, Ikemoto M, Kano M, Kominami E, Nonaka I, Ogawa T, Adams GR, Baldwin KM, Yasui N, Kishi K and Takeda S (2004): Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. *FASEB J*, **18**, 522-524.
- 2) Kakigi R, Yoshihara T, Ozaki H, Ogura Y, Ichinoseki-Sekine N, Kobayashi H and Naito H (2014): Whey protein intake after resistance exercise activates mTOR signaling in a dose-dependent manner in human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*, **114**, 735-742.
- 3) Abe T, Kohno S, Yama T, Ochi A, Suto T, Hirasaka K, Ohno A, Teshima-Kondo S, Okumura Y, Oarada M, Choi I, Mukai R, Terao J and Nikawa T (2013): Soy glycinin contains a functional inhibitory sequence against muscle-atrophy-associated ubiquitin ligase Cbl-b. *Int J Endocrinol*, 2013:907565.
- 4) 下村吉治 (2012): 分岐鎖アミノ酸の生理機能の多様性. *生化学*, **84**, 938-942
- 5) Tang JE, Moore DR, Kujbida G, Tarnopolsky M and Phillips S (2009): Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *J Appl Physiol*, **107**, 987-992.